

Uniwersytet Łódzki

16. 01. 2017 Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Katedra Genetyki Molekularnej

dr hab. Tomasz Śliwiński prof. nadzw. UŁ

Łódź, dnia 05 stycznia 2017 r.

Katedra Genetyki Molekularnej

Uniwersytetu Łódzkiego

O c e n a

pracy doktorskiej mgr Alicji Nowak

pt.: „*Znaczenie ekspresji oraz polimorfizmów genów związanych z neurodegeneracją dla rozwoju jaskry pierwotnej otwartego kąta*”

Jaskra pierwotna otwartego kąta (JPOK), określana również jako postępująca neuropatia nerwu wzrokowego, jest najczęstszą postacią jaskry, choroby będącej przyczyną nieodwracalnej utraty wzroku. Dane epidemiologiczne pokazują, że w Polsce stanowi ona prawie 80% osób chorych na jaskrę. JPOK charakteryzuje się śmiercią komórek zwojowych siatkówki, utratą aksonów oraz zmianą w wyglądzie tarczy nerwu wzrokowego. Patogeneza tej choroby nie jest jak dotąd w pełni poznana i podwyższone ciśnienie uważane jest za główny czynnik ryzyka dla tej odmiany jaskry, jednakże, istnieją doniesienia o występowaniu jaskry także u osób z prawidłowym parametrem ciśnienia. Stąd, uważa się, że musi istnieć inny mechanizm, niezależny od ciśnienia wewnątrzgałkowego, prowadzący do tego zwyrodnienia.

Z uwagi na fakt, iż jaskra zaliczana jest do chorób neurodegeneracyjnych, rolę w rozwoju tej choroby mogą odgrywać podobne czynniki jak w przypadku choroby Alzheimera, Parkinsona czy stwardnienia rozsianego. Do czynników tych, które stały się celem badań przeprowadzonych w ramach ocenianej dysertacji, zaliczyć można apolipoproteinę E (APOE), białko odgrywające kluczową rolę w procesie degeneracji komórek nerwowych w chorobie Alzheimera, gdzie jego podwyższony poziom prowadzi do wzrostu cytotoxyczności w komórce, głównie poprzez udział w tworzeniu złogów β -amyloidu. Dodatkowo w jaskrze, dochodzi do apoptozy komórek zwojowych siatkówki, co może być związane z deficytem neurotrofin, czyli związków niezbędnych do prawidłowego wzrostu i funkcjonowania

komórek nerwowych. Neurotropowy czynnik pochodzenia mózgowego (BDNF) jest jedną z głównych neurotrofin zaangażowaną w rozwój i przeżycie neuronów. Również białka szoku cieplnego (HSP), ze względu na swoją protekcyjną rolę w komórce, mogą również brać udział w naprawie uszkodzeń w obrębie nerwu wzrokowego mających miejsce podczas rozwoju jaskry.

Ze względu na brak wystarczającej wiedzy dotyczącej molekularnego podłoża postawiania JPOK, w tym czynników przyczyniających się do powstawania innych chorób neurodegeneracyjnych tj. apolipoproteina E, neurotropowy czynnik pochodzenia mózgowego, czy białka szoku cieplnego, uważam za bardzo zasadne podjęcie badań zaprezentowanych w recenzowanej rozprawie doktorskiej, szczególnie istotnych z punktu właściwego zrozumienia patologii tego schorzenia, jak i wyznaczenia dla niego nowych kierunków diagnostycznych oraz terapeutycznych.

Oceniana rozprawa ma typowy układ dysertacji doktorskiej. W części pogłądowej (34 strony) Doktorantka opisała kilka zagadnień pozostających w ścisłym związku z wykonywanym projektem badawczym. Mgr Alicja Nowak opisała epidemiologię oraz klasyfikację jaskry, skupiając się następnie na czynnikach ryzyka jaskry pierwotnej otwartego kąta. W kolejnej części Autorka skupiła się na teoriach neuropatii jaskrowej oraz czynnikach zaangażowanych w jej powstawanie. Tutaj szczegółowo zostały przedstawione: apolipoproteina E, neurotropowy czynnik pochodzenia mózgowego – BDNF oraz białka szoku cieplnego – HSP70, które były celem niniejszej pracy. Część ta została poparta, bardzo dobrze dobranymi, pozycjami literaturowymi, w większości pochodzącymi z ostatnich kilku lat. Bardzo czytelny wykaz skrótów pozwala na łatwe zapoznanie z treścią zawartą w rozprawie.

Celem pracy była analiza wariantów polimorficznych genów *APOE*, *BDNF* oraz *HSP70-1* oraz poziomu ich ekspresji w grupie pacjentów z jaskrą pierwotną otwartego kąta oraz w grupie kontrolnej, jak również korelacja otrzymanych wyników z parametrami klinicznymi niezbędna do właściwego określenia ryzyka występowania i progresji tego schorzenia w populacji polskiej.

Materiał do badań stanowiła krew, surowica oraz ciecz wodnista pobrane od pacjentów z jaskrą pierwotną otwartego kąta oraz od osób z grupy kontrolnej, u których nie zdiagnozowano jaskry. Próbkę krwi obwodowej uzyskano od 393 pacjentów z JPOK oraz od 436 osób z grupy kontrolnej. Próbkę surowicy i cieczy wodnistej uzyskano od 30 pacjentów z JPOK i 30 osób z grupy kontrolnej. Materiał do badań został otrzymany z Oddziału Klinicznego Okulistyki Uniwersytetu Medycznego w Warszawie. Badanie zostało zatwierdzone przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (nr zgody RNN/535/12/KB) oraz spełniło założenia Deklaracji Helsińskiej.

Uzyskane wyniki są jednoznaczne, i za każdym razem bardzo dobrze udokumentowane. Wyniki badań własnych Doktorantka zilustrowała za pomocą przejrzystych, dobrze skonstruowanych i opisanych 8 rycin oraz 20 tabel. W mojej ocenie, bardzo dobry sposób przedstawienia tak obszernej puli wyników uzyskanych przez Doktorantkę świadczy o dużej dojrzałości naukowej Autorki recenzowanej rozprawy doktorskiej.

Godne podkreślenia jest to, iż podczas realizacji zadań badawczych mgr Alicja Nowak opanowała i zastosowała szeroki wachlarz metod biologii molekularnej, wymagających dokładności oraz czasu.

Dobrze zaplanowany projekt badawczy i jego konsekwentna realizacja z wykorzystaniem właściwie dobranych metod oraz wnikliwa ocena statystyczna otrzymanych wyników zaowocowała uzyskaniem interesujących, oryginalnych ustaleń, które odpowiadają postawionym celom tj.:

- Występowanie genotypu T/T oraz allelu T polimorfizmu rs449647 genu *APOE*, genotypu C/T i T/T oraz allelu T polimorfizmu rs2030324 genu *BDNF* oraz genotypu A/A polimorfizmu rs6265 genu *BDNF* może mieć związek z podwyższonym ryzykiem jaskry pierwotnej otwartego kąta.
- Polimorfizm rs1043618 genu *HSP70-1* pozytywnie koreluje ze zwiększonym poziomem mRNA genu *HSP70-1*, natomiast polimorfizm rs449647 genu *APOE* ze zwiększonym poziomem białka APOE w grupie pacjentów z jaskrą pierwotną otwartego kąta, co może mieć związek ze zwiększeniem ryzyka występowania jaskry pierwotnej otwartego kąta.
- Korelacja z parametrami klinicznymi wykazała związek polimorfizmu rs1043618 genu *HSP70-1* i jego poziomu mRNA oraz polimorfizmu rs2030324 genu *BDNF* i jego poziomu mRNA, jak również poziomu białka APOE z progresją jaskry pierwotnej otwartego kąta.
- Warianty polimorficzne genów *APOE*, *BDNF*, *HSP70-1* oraz zmiany w poziomach ich ekspresji mogą mieć związek ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia, jak również z progresją jaskry pierwotnej otwartego kąta.

Dyskusja jest napisana bardzo dojrzałe, a Doktorantka dokładnie analizuje uzyskane wyniki, odnosząc się do wyników podobnych badań uzyskanych przez inne zespoły badawcze, oraz co bardzo istotne, wyjaśnia mechanizmy mogące leżeć u podstaw zaobserwowanych korelacji. Nie mogła dokonać takiego porównania we wszystkich poruszanych w tej pracy doktorskiej aspektach, ze względu na to, iż niektóre z uzyskanych rezultatów badań są unikatowe w skali światowej.

W pracy znalazły się nieliczne błędy edytorskie, co na tak obszerną rozprawę (118 str.) jest godne podkreślenia.

W tym miejscu z obowiązku recenzenta przedstawiam uwagi dotyczące drobnych, nielicznych uchybień oraz własne sugestie:

- W tej bardzo starannie napisanej pracy znalazły się też wyjątki w postaci drobnych nieścisłości tj. wstęp strona 12, gdzie Autorka zalicza do schorzeń, zamiast przyczyn prowadzących do zmian w obrębie gałki ocznej: urazy mechaniczne, zabiegi chirurgiczne, czy stosowanie niektórych leków; dalej na stronie 40 zamiast, jak to Autorka pisze „klirensu β -amyloidu” użyłbym bardziej polskiego odpowiednika; również używanie pojęcia allelu zamiast allelela jest bardziej prawidłowe.
- Dlaczego w celach pracy znalazł się gen *HSPA1A*, a w wynikach oraz dyskusji oraz wnioskach mamy opisany gen *HSP70-1*?

- Badania te są punktem wyjścia i mogą pozwolić na zaproponowanie nowych strategii diagnostycznych, jak i terapeutycznych dla jaskry pierwotnej otwartego kąta. W związku z tym chciałbym zapytać, czy istnieje możliwość kontynuacji tych wartościowych i obiecujących badań w Międzywydziałowej Katedrze Chemii i Biochemii Medycznej UM, poszerzonych o licznější pulę pacjentów. Chodzi mi tutaj przede wszystkim o badania wykorzystujące materiał w postaci surowicy oraz cieczy wodnistej. Pozwoliłoby to zwiększyć moc statystyczną badań, co z kolei, w przypadku otrzymania istotnych korelacji, mogłoby w przyszłości pozwolić na zwiększenie grupy markerów diagnostyczno-prognostycznych dla tego typu schorzenia?

Te drobne uwagi, a właściwie sugestie, mają charakter roboczy i nie zmieniają mojej bardzo wysokiej oceny niniejszej dysertacji. Praca ta stanowi dobry przykład samodzielnego rozwiązania projektu badawczego, mogącego przynieść wymierne efekty praktyczne, a uzyskane podczas wykonywania tej pracy doktorskiej wyniki, wpisują się jak najbardziej w wieloletnią, bardzo owocną współpracę pomiędzy posiadającym renomę międzynarodową, kierownikiem zespołu badawczego, Panem prof. dr. hab. Ireneuszem Majsterkiem, oraz zespołem wyśmienitych okulistów Profesorów Jerzego oraz Jacka Szaflików. Współpraca ta dała i wciąż daje podwaliny (czego przykładem jest niniejsza dysertacja) dla zrozumienia podłoża molekularnego wielu chorób oczu, w tym jaskry pierwotnej otwartego kąta, bezcenne z punktu proponowania nowych strategii diagnostycznych oraz terapeutycznych tych schorzeń.

Promotor dysertacji Pan prof. dr. hab. Ireneusz Majsterk oraz Doktorantka są współtwórcami tej pracy, którą z pełnym przekonaniem można określić mianem sukcesu naukowego. Potwierdzeniem mojej tezy jest to, że wyniki uzyskane podczas realizacji pracy doktorskiej zostały opublikowane w 3 czasopismach naukowym z listy JCR.

Rozumiem, że promotor pracy, Pan Profesor Ireneusz Majsterk zdecydował się na złożenie pracy doktorskiej w tradycyjnej formie, pomimo, że miał możliwość wykorzystania tzw. „zszywki” z cyklu publikacji, ze względu na jej szerszą formę, która uwzględniała wyniki dotyczące ekspresji na poziomie białka. Jestem przekonany, że i te ostatnie rezultaty znajdą niedługo swoje odzwierciedlenie w postaci publikacji w dobrych czasopismach z listy JCR.

Dodatkowym, bardzo ważnym aspektem, podkreślających rangę przeprowadzonych badań realizowanych w ramach pracy doktorskiej, jest ich finansowanie z grantów NCN oraz Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.).

Uwzględniając idee i koncepcje badawcze oraz warsztat praktyczny zastosowany w pracy, z przyjemnością przedkładam do Wysokiej Rady Wydziału Wojskowo-Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi wniosek o dopuszczenie Pani mgr Alicji Nowak do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz ze względu na unikatowy charakter tej dysertacji, kluczowy dla właściwego kierunku rozwoju diagnostyki, ale również odpowiedniego leczenia jaskry, nie tylko w Polsce, ale i na świecie, a także godny podziwu ogrom pracy włożonej w jej wykonanie, w tym niezwykłą staranność i dokładność, **wnioskuję o wyróżnienie** recenzowanej pracy doktorskiej.



dr hab. Tomasz Śliwiński prof. nadzw. UŁ